

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

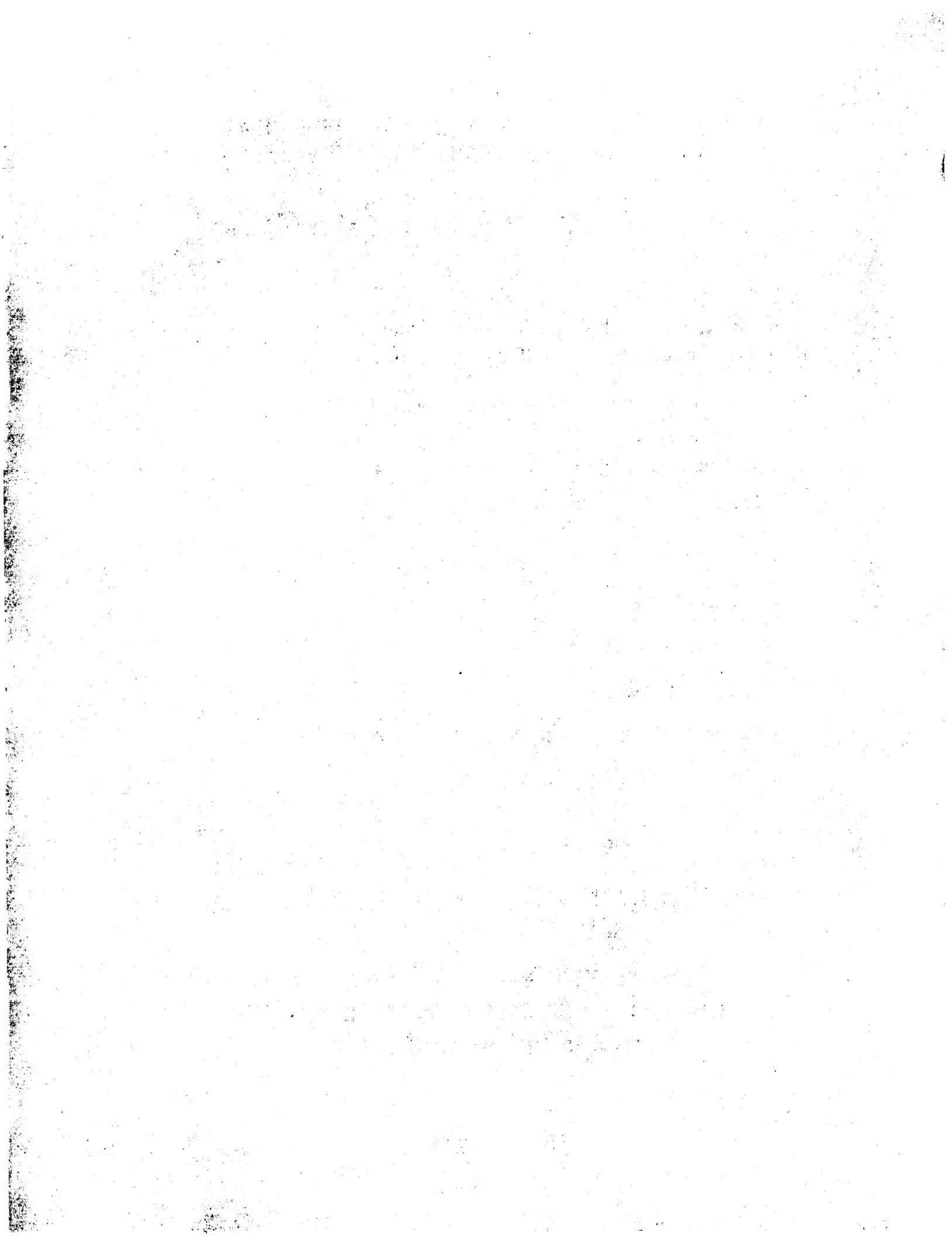
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**





REC'D 29 NOV 1999
WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

**PRIORITY
DOCUMENT**
COPIE OFFICIELLE

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

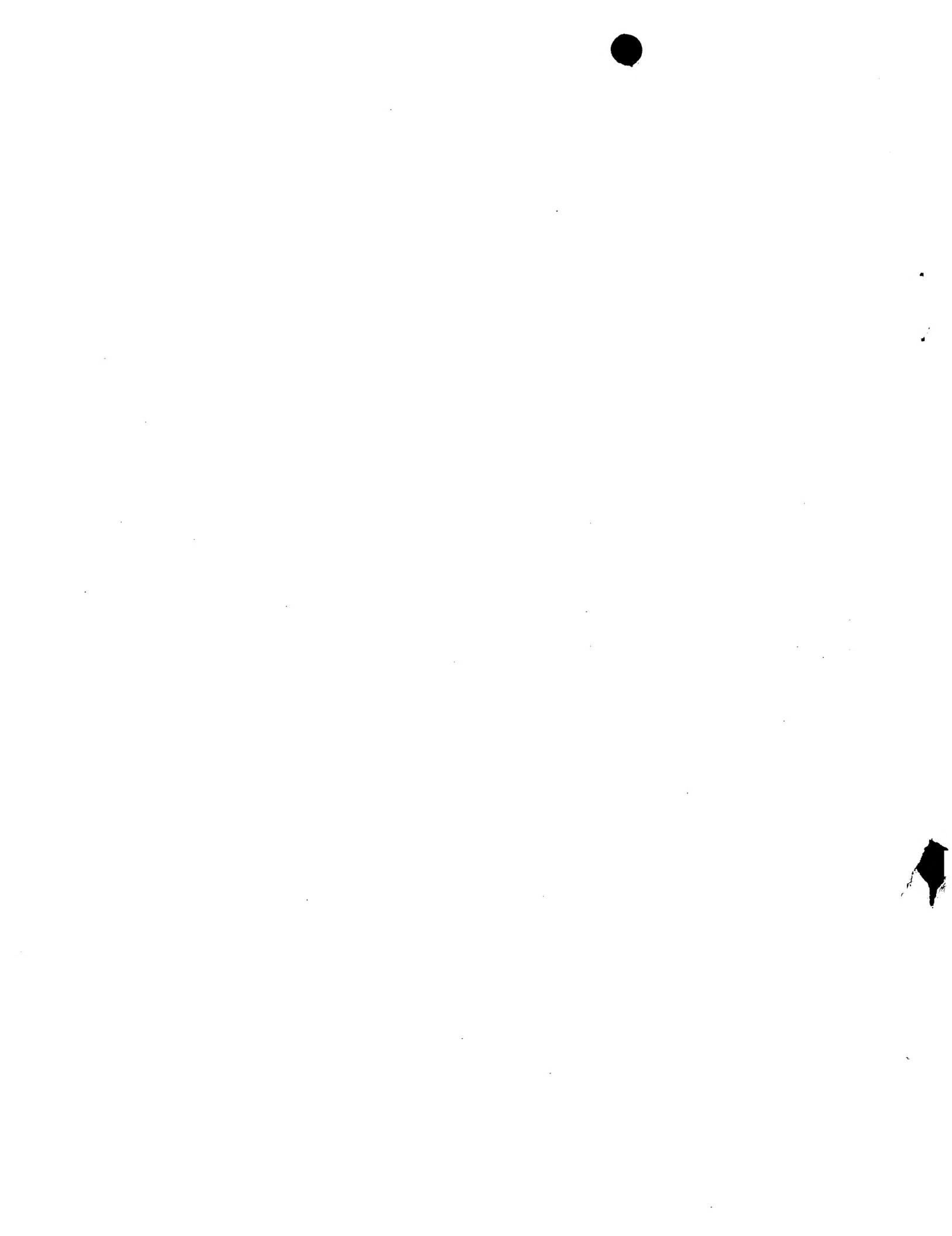
17 NOV. 1999
Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis. rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

06 NOV 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 14007

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

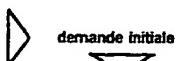
75

DATE DE DÉPÔT

06 NOV. 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

- brevet d'invention demande divisionnaire
 certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen



1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET REGIMBEAU
26, Avenue Kléber
75116 PARIS

n°du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
227411 317777 872 01 45 00 92 02

certificat d'utilité n° date

Établissement du rapport de recherche

- différé immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, pour le ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques humaines

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

PIERRE FABRE MEDICAMENT

Forme juridique

SOCIETE ANONYME

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

Pays

45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui

non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTIÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)

921169

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

J



DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 14007

TITRE DE L'INVENTION : Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, pour le ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques humaines

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

PIERRE FABRE MEDICAMENT
45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

BONNEFOY Jean-Yves
Les Noyers
74350 Le Sappey, FR

LECOANET Sybille
41, A1 résidence du Golf
1196 Gland, CH

AUBRY Jean-Pierre
60, chemin des Crêts des
Crêts
74350 Cuvat, FR

JEANNIN Pascale
135, chemin de Révule
01220 Divonne Les Bains, FR

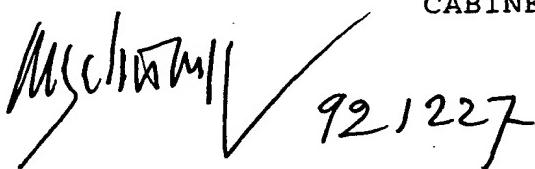
BAUSSANT Thierry
35, rue Jean Jaurès
01200 Bellegarde, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

17 novembre 1998

CABINET REGIMBEAU


921227

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

ORIGINAL

1

L'invention concerne l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, de préférence la protéine P40 Klebsiella pneumoniae, pour le ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les 5 cellules présentatrices d'antigènes, notamment les cellules dendritiques humaines. L'invention a également pour objet l'utilisation de la protéine OmpA pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention et/ou 10 le traitement de maladies, notamment les cancers associés à un antigène tumoral, les maladies auto-immunes ou les maladies infectieuses.

La vaccination est un moyen efficace de prévenir ou réduire les infections virales ou bactériennes. Le succès des campagnes de vaccination dans ce domaine a permis 15 d'étendre le concept de vaccin dans d'autres domaines tels que celui du cancer et des maladies auto-immunes. En ce qui concerne par exemple certaines formes de cancer, l'inefficacité de thérapies classiques et/ou leurs effets secondaires, comme la chimio- ou la radiothérapie, a motivé 20 la recherche de thérapie alternative. Ainsi, les antigènes tumoraux spécifiques exprimés à la surface des cellules tumorales peuvent être utilisés comme cible en immuno-thérapie pour l'élimination de ces cellules. Un des problèmes majeurs couramment rencontrés pour la préparation 25 de ces vaccins est que les antigènes vaccinaux lorsqu'ils sont administrés seuls chez l'hôte, ne sont pas assez immunogéniques pour induire une réponse immunitaire suffisamment efficace pour conférer la protection recherchée. Ces antigènes sont ainsi souvent couplés de 30 manière covalente à une molécule porteuse telle que par exemple épitope de la toxine diphtérique, l'anatoxine tétanique (TT), un antigène de surface du virus de l'hépatite B, l'antigène VP1 du virus de la poliomyélite ou toute autre toxine ou antigène viral ou bactérien tel que 35 des protéines antigéniques issues de la membrane externe d'entérobactérie qui ont la propriété de potentialiser la réponse immunitaire (humorale et cellulaire) de l'antigène

qui lui est associée comme la protéine OmpA nommée P40 issue de *Klebsiella pneumoniae* (décrite dans les demandes internationales de brevet WO 95/27787 et WO 96/14415). Néanmoins, dans la plupart des cas un autre composant s'est 5 avéré nécessaire pour augmenter l'efficacité du vaccin, et actuellement le seul adjuvant autorisé chez l'homme est l'Alum.

Grâce à l'immunologie, il a été récemment découvert que les cellules dendritiques (CD) jouaient un rôle majeur 10 dans le système immunitaire. Ces cellules, dérivées des cellules souches de la moelle osseuse, sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles impliquées dans la réponse immune primaire spécifique d'un antigène (Peters J. et al., 1996). Elles ingèrent ou internalisent les 15 antigènes et présentent les fragments de ces antigènes à des cellules T naïves. Cette ingestion induit à la surface des cellules dendritiques l'expression de molécules de costimulation telles le CD80 et le CD86. Ces molécules permettent une interaction étroite avec les cellules T 20 (Girolomoni G. et Ricciardi-Castagnoli P., 1997, Immunol. Today, 18, 102-104). Les cellules dendritiques sont distribuées de manière diffuse dans les tissus. Elles sont retrouvées aux niveaux de la peau et des organes lymphoïdes (Hinrich J. et al., 1996, Immunol. Today, 17, 273-277).

Grâce à leur efficacité à présenter les antigènes et à stimuler le système immunitaire, les cellules dendritiques ont été utilisées pour générer des réponses cytotoxiques CTL antivirales (Ludewig B. et al., 1998, J. Virol., 72, 3812-3818 ; Brossard P. et al., 1997, J. Immunol., 158, 30 3270-3276) ou anticancéreuses (Nestle F.O. et al., 1998, Nat. Med., 4, 328-332). Les approches ont consisté à charger les cellules dendritiques *ex vivo* avec l'antigène d'intérêt (peptides ou lysat cellulaire) et réimplanter ces cellules chez le patient. D'autres approches consistent à 35 transfacter *ex vivo* les cellules dendritiques avec le gène codant pour l'antigène d'intérêt et à réinjecter ces cellules transfectées (Gilboa E. et al., 1998, Cancer

Immunol. Immunother., 46, 82-87). Ces approches ont été utilisées avec succès chez la souris et récemment chez l'homme (Hsu F.J. et al., 1996, Nat. Med., 2, 52-58). Les cellules dendritiques chargées en antigènes présentent les peptides par le biais de molécules de classe I ou II et induisent l'activation des lymphocytes T CD4 ou CD8+. Par conséquent, la possibilité de diriger les antigènes désignés, tels que des protéines ou des polysaccharides, ou des vecteurs viraux capables de transférer des gènes codant pour ces antigènes vers les cellules dendritiques permettrait d'améliorer l'efficacité de la stimulation du système immunitaire. De plus, le ciblage spécifique des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), notamment les cellules dendritiques, permettrait d'éviter les étapes de prélèvement, de purification, de traitement *ex vivo* de cellules CPA autologues ou hétérologues avec les antigènes tumoraux ou les vecteurs viraux et la réimplantation des cellules CPA traitées.

Afin de cibler spécifiquement les cellules dendritiques avec des substances actives d'intérêt, telles que des protéines ou des vecteurs viraux capables de transférer des gènes codant pour ces protéines d'intérêt, de nombreux travaux ont consisté à identifier des molécules qui se fixeraient préférentiellement sur les cellules dendritiques ou des récepteurs qui seraient exprimés spécifiquement sur les cellules dendritiques. Un récepteur DEC 205 impliqué dans la prise en charge de l'antigène a été identifié sur des cellules dendritiques murines (Jiang W. et al., 1995, Nature, 375, 151-155) et humaines (Kato M. et al., 1998, Immunogenetics, 47, 442-450). L'analyse de la structure de ce récepteur met en évidence des domaines de reconnaissance d'hydrates de carbone qui seraient impliqués dans la capture, l'internalisation et/ou la présentation d'antigènes portant des résidus d'hydrates de carbone. Néanmoins, les auteurs ne donnent aucune information sur les ligands pouvant être fixés par ce récepteur. D'autre part, les auteurs mentionnent que les domaines de

reconnaissance d'hydrates de carbone du récepteur DEC-205 qui seraient impliqués dans la capture, l'internalisation et/ou la présentation d'antigènes (domaines riches en cystéine) sont également présents dans plus de 50 protéines 5 dont certains récepteurs cellulaires.

Ainsi, il existe aujourd'hui un besoin de disposer d'un composé capable de cibler spécifiquement une cellule présentatrice d'antigène (CPA), notamment une cellule dendritique, et qui soit capable en outre d'être 10 internalisé par ladite cellule. Un tel composé capable de se fixer spécifiquement sur ces cellules, puis d'être internalisé aurait comme avantage de pouvoir être utilisé comme composé pour le transport et le ciblage de substance biologiquement active dont l'efficacité est modulée et/ou 15 liée à la fixation et/ou à l'internalisation de cette substance par ces cellules. D'autre part, il serait avantageux que ce composé recherché puisse être facilement associé à la substance active par couplage chimique, par couplage résultant d'une fusion génétique ou puisse être 20 exprimé à la surface d'une cellule hôte ou encore à la surface d'une particule virale pour le transfert de gène d'intérêt dans ces cellules CPA.

Les auteurs de la présente invention ont mis en évidence de manière surprenante qu'une protéine de la 25 membrane externe de type OmpA d'entérobactérie, notamment la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*, est capable non seulement de se fixer spécifiquement sur une cellule CPA mais également capable d'être internalisée par ladite cellule CPA, notamment par une cellule dendritique.

30 Ainsi, la présente invention est relative à l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments pour le ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes.

35 Par cellules présentatrices d'antigènes, on entendra désigner dans la présente invention, les cellules CPA professionnelles formant partie intégrante du système

immunitaire telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes B ou les monocytes.

Dans la présente invention, on entend désigner également par le terme « protéine » les peptides ou les 5 polypeptides et par le terme « OmpA » (pour « Outer Membrane Protéin »), les protéines de la membrane externe de type A.

Par fragment d'une protéine OmpA, on entend désigner tout fragment de séquence d'acides aminés compris dans la 10 séquence d'acides aminés de la protéine OmpA capable de se fixer spécifiquement sur les cellules CPA, notamment les cellules dendritiques, et comprenant au moins 5 acides aminés, de préférence 10 acides aminés ou de manière plus 15 préférée 15 acides aminés, lesdits fragments étant en outre capables d'être internalisés dans lesdites cellules CPA.

Par « substance biologiquement active », on entend désigner tout composé capable d'exercer une activité thérapeutique et dont l'activité peut être modulée par l'intermédiaire des cellules CPA. On peut citer comme 20 exemple de telles substances biologiquement actives, mais sans s'y limiter, les composés immunogènes tels que des antigènes ou haptènes de nature protéique, poly- ou oligosaccharidique, glycoprotéique, lipoprotéique ou en 25 générale d'origine organique, ces composés immunogènes pouvant être portés par des structures complexes telles que des bactéries ou des particules virales.

Par « substance biologiquement active », on entend également désigner tout composé capable de modifier l'activité fonctionnelle des cellules CPA, en particulier 30 leur croissance, leur différentiation ou leur système d'expression. On peut citer comme exemple de telles substances biologiquement actives, mais sans s'y limiter, les facteurs de croissance cellulaire dont les cytokines (IL-4, IL-3, GM-CSF, TNF- α), les acides nucléiques codant 35 pour des protéines d'intérêt homologues ou hétérologues et capables d'être exprimées par les cellules CPA.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments se fixe 5 spécifiquement sur les cellules présentatrices d'antigènes et en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments est internalisée dans les cellules présentatrices d'antigènes.

De préférence, l'invention comprend l'utilisation 10 d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont choisies parmi les cellules dendritiques, les monocytes ou les lymphocytes B, de manière plus préférée, les cellules 15 dendritiques.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention comprend l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de 20 ses fragments, est obtenue à partir d'une culture de ladite entérobactérie par un procédé d'extraction.

Les procédés d'extraction de protéines de membrane bactériennes sont connus de l'homme de l'art et ne seront développés dans la présente description. On peut citer par 25 exemple, mais sans s'y limiter le procédé d'extraction décrit par Haeuw J.H. et al. (Eur. J. Biochem, 255, 446-454, 1998).

Dans un autre mode de réalisation préféré, l'invention comprend également l'utilisation d'une protéine OmpA 30 d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

Les méthodes de préparation de protéines recombinantes 35 sont aujourd'hui bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description, on pourra néanmoins se référer à la méthode décrite dans les

exemples. Parmi les cellules utilisables pour la production de ces protéines recombinantes, il faut citer bien entendu les cellules bactériennes (Olins P.O. et Lee S.C., 1993, Recent advances in heterologous gene expression in *E. coli*.
5 Curr. Op. Biotechnology 4:520-525), mais également les cellules de levure (Buckholz R.G., 1993, Yeast Systems for the Expression of Heterologous Gene Products. Curr. Op. Biotechnology 4:538-542), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de
10 mammifère (Edwards C.P. et Aruffo A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4:558-563) mais également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en oeuvre des baculovirus par exemple
15 (Luckow V.A., 1993, Baculovirus systems for the expression of human gene products. Curr. Op. Biotechnology 4:564-572).

De manière tout à fait préférée, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

20 En particulier, l'invention est relative à l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la séquence d'acide aminé de ladite protéine OmpA de *Klebsiella pneumoniae*, ou l'un de ses fragments, comprend :
a) la séquence d'acide aminé de séquence SEQ ID N° 2 ;
25 b) la séquence d'acide aminé d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ;
ou
c) la séquence d'acide aminé d'un fragment d'au moins 5
30 acides aminés d'une séquence telle que définie en a) ou b).
L'invention comprend en outre l'utilisation selon

l'invention, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est choisie parmi les protéines ou les peptides, les lipopeptides, les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides et les substances chimiques.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments, notamment par un couplage chimique.

Dans un mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou de ladite substance biologiquement active pour faciliter le couplage chimique, de préférence ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

Selon l'invention, il est possible d'introduire un ou plusieurs éléments de liaison, notamment des acides aminés pour faciliter les réactions de couplage entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et la substance biologiquement active, telle qu'un antigène ou un haptène. Le couplage covalent entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et la substance biologiquement active, telle qu'un antigène ou un haptène selon l'invention peuvent être réalisés à l'extrémité N- ou C- terminale de la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments. Les réactifs bifonctionnels permettant ce couplage seront déterminés en fonction de l'extrémité de la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, choisie pour effectuer le couplage et de la nature de la substance biologiquement active à coupler.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

Les conjugués issus d'un couplage à ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, peuvent être préparés par recombinaison génétique. La protéine chimérique ou hybride (conjugué) peut être produite par des techniques d'ADN recombinant par insertion ou addition à la séquence d'ADN codant pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, d'une séquence codant pour ladite substance biologiquement active de nature protéique.

Les procédés de synthèse des molécules hybrides englobent les méthodes utilisées en génie génétique pour construire des polynucléotides hybrides codant pour les séquences polypeptidiques recherchées. On pourra, par exemple, se référer avantageusement à la technique d'obtention de gènes codant pour des protéines de fusion décrite par D.V. Goeddel (*Gene expression technology, Methods in Enzymology*, vol. 185, 3-187, 1990).

L'invention concerne tout particulièrement l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est un antigène ou un haptène.

Sous un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention pour moduler la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène, de préférence pour améliorer la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène.

L'invention comprend également l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une maladie par une substance active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à son internalisation par des cellules présentatrices d'antigènes, de préférence par des cellules dendritiques.

De préférence, l'utilisation selon l'invention est relative à la préparation d'une composition pharmaceutique

destinée à prévenir ou à traiter les cancers, de préférence les cancers associés à un antigène tumoral, les maladies auto-immunes, les allergies, les rejets de greffes, les maladies cardiovasculaires, les maladies du système nerveux central, les maladies inflammatoires, les maladies infectieuses ou les maladies liées à une immunodéficiency.

L'invention a en particulier pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir ou à traiter une maladie infectieuse ou un cancer associé à un antigène tumoral.

L'invention comprend en outre l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre un adjuvant favorisant la réponse immune, tel que l'Alum.

L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité, notamment sous la forme d'un liposome, d'un vecteur viral ou d'une cellule hôte transformée capable d'exprimer une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Légendes des figures :

Figure 1 : Fixation de rP40-Alexa sur différents types cellulaires.

Après incubation de rP40-Alexa sur différents types cellulaires, la fixation spécifique de rP40-Alexa (trait

gras) est mesurée par cytométrie en flux. La fixation d'une protéine non relevante (glycophorine) est représentée en trait fin.

Figure 2 : Influence de la concentration de rP40 sur la fixation sur les cellules dendritiques.
5

Figure 3 : Inhibition de la fixation de rP40-Alexa par rP40 non marquée sur des cellules dendritiques.

Après incubation de cellules dendritiques avec différentes concentrations de rP40 non marquée, rP40-Alexa est ajoutée.

10 La fixation de rP40-Alexa est quantifiée par cytométrie en flux.

Figure 4 : Evaluation de la fixation de différentes protéines marquées sur les cellules dendritiques.

Des protéines porteuses P40, TT (anatoxique tétanique) et 15 BB (dérivées de la protéine G du streptocoque) marquées à l'Alexa sont incubées avec des cellules dendritiques (trait plein). Une protéine non relevante est utilisée comme témoin négatif (trait fin). La fixation est mesurée par cytométrie en flux.

20 Figures 5A et 5B : Internalisation de rP40-Alexa dans les cellules dendritiques.

Après incubation de cellules dendritiques avec rP40-Alexa à 4°C (panel gauche, figure 5A) ou à 37°C (panel droit, figure 5B), les cellules sont observées par microscopie 25 confocale (grossissement x 220).

Exemple 1 : Clonage du gène rP40

Le gène codant pour la protéine recombinante P40 nommée rP40 a été obtenu par amplification par PCR à partir 30 de l'ADN génomique de *Klebsiella pneumoniae* IP I145 (Nguyen et col., Gene, 1998). Le fragment de gène codant de rP40 est inseré dans divers vecteurs d'expression, en particulier un vecteur sous le contrôle du promoteur de l'opéron Trp. La séquence d'acides aminés de la protéine 35 rP40 et la séquence nucléotidique codant pour la protéine P40 sont représentées respectivement par les séquences SEQ

ID N° 2 et SEQ ID N° 1 dans la liste des séquences ci-après.

Une souche productrice *E. coli* K12, a été transformée par un vecteur d'expression pvalP40. La protéine rP40 est produite sous forme de corps d'inclusion avec un rendement important (> 10 %, g de protéines/g de biomasse sèche). Cet exemple n'est qu'une illustration de l'expression de la rP40, mais elle peut être étendue à d'autres souches bactériennes ainsi que d'autres vecteurs d'expression.

10

Exemple 2 : Procédé de fermentation de protéines de fusion rP40

Un erlenmeyer contenant 250 ml de milieu TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) renfermant de l'Ampicilline (100 µg/ml, Sigma) et de la Tétracycline (8 µg/ml, Sigma) est inoculé avec la souche *E. coli* recombinante décrite ci-dessus. L'incubation est réalisée pendant une nuit à 37°C puis 200 ml de cette culture est utilisée pour ensemencer 2 litres de milieu de culture dans un fermenteur (Biolafitte, France). De manière assez classique, le milieu de culture peut être composé d'agents chimiques, supplémentés par les vitamines, des extraits de levure, connus pour avoir une croissance à densité élevée de cellules bactériennes.

Les paramètres contrôlés durant la fermentation sont : le pH, l'agitation, la température, le taux d'oxygénation, l'alimentation de sources combinées (Glycérol ou Glucose). De manière générale, le pH est réglé à 7,0, la température est fixée à 37°C. La croissance est contrôlée en alimentant en glycérol (87 %) à un débit constant (12 ml/h) pour maintenir le signal de tension de l'oxygène dissous à 30 %. Lorsque la turbidité de la culture (mesurée à 580 nm) atteint la valeur de 80 (après environ 24 heures de culture), la production des protéines est déclenchée par addition de l'acide indole acrylique (IAA) à la concentration finale de 25 mg/l. Environ 4 heures après induction, les cellules sont récoltées par centrifugation. La quantité de biomasse humide obtenue est d'environ 200 g.

Exemple 3 : Procédé d'extraction et de purification de la protéine rP40

Extraction de la rP40

5 Après centrifugation du bouillon de culture (4000 rpm, 10 min, 4°C), les cellules sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5. Les insolubles ou corps d'inclusion sont obtenus après un traitement par le lysozyme (0,5 g/litre, 1 heure température ambiante / agitation douce). Le culot de corps d'inclusion obtenu par centrifugation (15 min à 10 000 g à 4°C) est repris dans un tampon Tris-HCl 25 mM à pH 8,5 et 5 mM MgCl₂, puis centrifugé (15 min à 10 000 g).

10 On solubilise les corps d'inclusion à 37°C pendant 2 heures dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant 7 M urée (agent dénaturant) et 10 mM Dithiothréitol (réduction des ponts disulfures). Une centrifugation (15 min à 10 000 g) permet d'éliminer les particules non solubles.

15 On resuspend ensuite dans 13 volumes de tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant du NaCl (8,76 g/l) et du Zwittergent 3-14 (0,1 %, p/v). La solution est laissée pendant une nuit à température ambiante sous agitation douce au contact de l'air (favoriser la renaturation de la protéine par dilution et réoxydation des ponts disulfures).

20 **Purification de la protéine rP40**

25 Etape de chromatographie d'échange d'anions.

30 Après une nouvelle centrifugation, la solution est dialysée contre un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14 (100 X volumes de tampon) pendant une nuit à 4°C.

35 Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur d'anions forts (gel Biorad Macro Prep High Q) équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus à un débit linéaire de 15 cm/h. Les protéines sont détectées à 280 nm. La protéine rP40 est éluée, avec un débit linéaire de 60 cm/h, pour une concentration de 0,2 M en

NaCl dans le tampon TrisHCl 25 mM, pH 8,5 ; 0,1 % Zwittergent 3-14.

Etape de chromatographie d'échange de cations

Les fractions contenant la protéine rP40 sont poolées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un système de cellule à agitation Amicon utilisé avec une membrane Diaflo de type YM10 (seuil de coupure 10 kDa) pour des volumes de l'ordre de 100 ml, ou à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel Minitan Millipore utilisé avec des plaques de membranes possédant un seuil de coupure 10 kDa pour des volumes supérieurs. La fraction ainsi concentrée est dialysée pendant une nuit à 4°C contre un tampon citrate 20 mM pH 3,0, à 0,1 % de Zwittergent 3-14.

Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur de cations forts (gel Biorad Macro Prep High S) équilibrée dans le tampon citrate 20 mM pH 3,0, à 0,1 % de Zwittergent 3-14. La protéine rP40 est éluee (vitesse 61 cm/h) pour une concentration 0,7 M en NaCl. Les profils électrophorétiques montrent un degré de pureté de l'ordre de 95 %. L'état de la protéine est suivi par SDS-PAGE. Selon sa forme dénaturée ou native, la protéine P40 extraite de la membrane de *Klebsiella pneumoniae* possède un comportement électrophorétique (migration) caractéristique. La forme native (structure en feuilles β) présente en effet une masse moléculaire plus faible que la forme dénaturée (structure en hélices α) sous l'action d'un agent dénaturant, tel que l'urée ou le chlorhydrate de guanidine, ou par chauffage à 100°C en présence de SDS). La protéine rP40 n'est pas correctement renaturée en fin de renaturation, que celle-ci soit réalisée en absence ou en présence de 0,1 % ; (p/v) Zwittergent 3-14. Par contre, une renaturation totale est obtenue après dialyse contre un tampon Tris/HCl 25 mM pH 8,5 contenant 0,1 % (p/v) de Zwittergent 3-14. Toutefois, il faut noter que cette renaturation n'est obtenue que lorsque l'étape de dilution et le traitement à température

ambiante sont réalisés eux-mêmes en présence de Zwittergent 3-14 (résultats négatifs en absence de détergent).

Exemple 4 : Fixation spécifique de rP40 sur les cellules 5 présentatrices d'antigène (CPA). Méthodologie

Purification des lymphocytes T humains

Les cellules mononucléées (CMN) sont isolées à partir du sang périphérique de volontaires sains par centrifugation (1800 rpm, 20 min, température ambiante), sur un gradient de Ficoll. Après centrifugation, les CMN, situées à l'interface ficoll/plasma, sont récoltées et lavées 2 fois avec du milieu de culture complet (MC) (RPMI 1640 + 10 % SVF + L-glutamine + antibiotique). Les 10 lymphocytes T sont alors isolés par la technique du rosetting qui utilise leur capacité à se fixer aux globules rouges de mouton (GRM). Brièvement, les CMN sont incubées avec des GRM pendant 1 heure à 4°C. Après centrifugation sur gradient de ficoll, les lymphocytes B et les monocytes 15 sont situés à l'interface alors que les lymphocytes T fixés aux GRM sont dans le culot cellulaire. Après récupération du culot cellulaire et lyse des GRM avec une solution saline hypotonique, la pureté des lymphocytes T est appréciée par cytométrie en flux avec un anticorps anti-CD3 20 et est supérieure à 95 %. 25

Purification des monocytes humains

Les monocytes sont purifiés à partir des CMN par sélection positive en utilisant la technologie MACS (Magnetic Activated Cell Sorter). Les CMN sont marquées 30 avec un anticorps anti-CD14 couplé à des particules magnétiques puis passées sur une colonne aimantée. Les monocytes sur lesquels sont fixés les complexes anticorps-colloïde restent dans la colonne alors que les cellules n'ayant pas fixé l'anticorps sont éluées par lavages 35 successifs. Ensuite les monocytes sont décrochés en effectuant des lavages en absence d'aimant. La pureté de la fraction collectée est supérieure à 98 %.

Génération de cellules dendritiques humaines (CD) à partir de monocytes

Les monocytes purifiés sont cultivés à la concentration de 10⁶/ml dans du MC pendant 6 à 7 jours en 5 présence de IL 4 (20 ng/ml) et de GMCSF (20 ng/ml). Les CD générées à ce stade sont des CD immatures qui expriment le CD1a et pas ou peu le CD83. Leur phénotype est vérifié par la technique de cytométrie en flux.

Purification des lymphocytes B humains à partir d'amygdales

10 Les amygdales sont broyées et les cellules récoltées sont déposées sur un gradient de ficoll. Les CMN recueillies à l'interface sont lavées puis incubées avec des GRM. Après ficoll, les lymphocytes B sont situés à l'interface alors que les lymphocytes T fixés aux GRM sont 15 dans le culot cellulaire. Les lymphocytes B sont alors lavés. Leur pureté, vérifiée par cytométrie en flux, est supérieure à 96%.

Culture des lignées cellulaires

20 Les lignées cellulaires RPMI 8866, DAUDI, HL60 et Jurkat sont cultivées dans du MC.

Couplage de rP40 au fluorochrome Alexa488

La concentration de la protéine rP40 est ajustée à 2 mg/ml dans du PBS. A 500 µl de la protéine sont ajoutés 25 50 µl de bicarbonate de sodium à 1 M. La solution est alors transférée dans un tube de réaction contenant le colorant Alexa488 et le couplage s'effectue à température ambiante. Après 1 h, la réaction de couplage est arrêtée par ajout de 15 µl d'hydroxylamine. La protéine marquée est séparée du colorant libre par purification sur colonne.

30 La quantité de rP40 marquée à l'Alexa488 est ensuite estimée par dosage colorimétrique.

- Etude de la fixation de P40-Alexa488 sur les différentes cellules par cytométrie en flux.

35 Pour chaque marquage, 200 000 cellules sont lavées avec du tampon FACS (PBS + 1 % BSA + 0,01 % azide de sodium) et resuspendues, dans une plaque 96 puits à fond conique, dans 50 µl de tampon FACS. La protéine P40-

Alexa488 ou la protéine contrôle (glycophorine-Alexa488) sont alors ajoutées à 10^{-6} M pendant environ 1 heure à 4°C. Après incubation, les cellules sont alors lavées 3 fois avec du tampon FACS puis resuspendues dans 200 µl de ce même tampon et analysées par cytométrie en flux.

Résultat

La protéine rP40 se fixe sélectivement sur les CPA humaines telles que :

- les monocytes issus du sang périphérique,
- 10 - les cellules dendritiques générées à partir des monocytes du sang périphérique,
- les lymphocytes B issus d'amygdale, les lignées lymphocytaires B : DAUDI et RPMI 8866 (cf. Fig. 1) et les lymphocytes B issus du sang périphérique (résultat non 15 présenté).

Aucune fixation n'est observée sur des cellules qui ne possèdent pas la capacité de présenter des antigènes tels que des lymphocytes T du sang périphérique non activés, la lignée lymphocytaire T Jurkat non activée et la lignée 20 monocytaire HL60 non activée.

Exemple 5 : La fixation de rP40 aux CD est spécifique

1) La fixation de rP40 aux CD est dépendante de la dose.

25 Méthode

200 000 CD sont lavées avec du tampon FACS et incubées dans 50 µl de tampon en présence de différentes concentrations de rP40 (de 10^{-10} à 5×10^{-6} M) pendant environ 1 heure à 4°C. Après incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon FACS puis resuspendues dans 30 50 µl de ce même tampon contenant 5 µg/ml d'un anticorps polyclonal de lapin anti-P40 ou d'un anticorps IgG de lapin contrôle. Après 20 minutes d'incubation, les cellules sont relavées et incubées dans 100 µl de tampon FACS contenant 35 un anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin marqué à la fluorescéine (dilué au 1:200). Après 20 minutes

d'incubation, les cellules sont lavées, reprises dans du tampon FACS et analysées par cytométrie en flux.

Résultat

La fixation de rP40 au CD est significative à partir de 10^{-7} M ($p<0.001$) et maximale à 2×10^{-6} M (cf. Fig. 2).

2) La protéine rP40 non marquée diminue la fixation de rP40 Alexa488 aux CD.

Méthode

Afin de démontrer la spécificité de la fixation de P40, une compétition entre rP40-Alexa488 et rP40 non marquée a été réalisée. Les CD ont été incubées 10 minutes avec 5×10^{-8} à 2×10^{-6} M de rP40 non marqué puis P40-Alexa488 (utilisé à 2×10^{-6} M) a été ajouté. Après 20 minutes d'incubation à 4°C, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux comme décrit auparavant.

Résultat

La protéine rP40 non marquée inhibe de manière dépendante de la dose la fixation de 2×10^{-6} M de P40 Alexa488 (à plus de 60 % lorsqu'il est utilisé à 2×10^{-6} M) (cf. Fig. 3).

Exemple 6 : Parmi les protéines porteuses, TT, BB et rP40, seule la protéine rP40 se fixe aux CD.

Méthode

Les protéines porteuses, anatoxine tétanique (TT) et BB (d'origine de la protéine G du Streptocoque ayant une affinité à l'albumine humaine), ainsi que la protéine rP40 et la protéine contrôle glycophorine A ont été marquées par Alexa488 comme précédemment décrit. La fixation de ces molécules sur les CD a été évaluée par cytométrie en flux comme décrit auparavant. Brièvement, 200 000 CD sont lavées avec du tampon FACS et incubées dans 50 µl de tampon en présence de 10^{-6} M de chacune des protéines marquées par Alexa488 pendant environ 1 heure à 4°C. Après incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon FACS puis

resuspendues dans 200 μ l de ce même tampon et analysées par cytométrie en flux.

Résultat

A la concentration de 10^{-6} M, seule rP40 se fixe aux 5 cellules dendritiques. Aucune fixation de TT, BB et glycophorine n'est détectée (cf. Fig. 4).

Exemple 7 : rP40 est internalisée par les CD

Méthode

10 200 000 CD sont lavées avec du tampon PBS-BSA 1 % et resuspendues, dans une plaque 96 puits à fond conique, dans 50 μ l de tampon PBS-BSA (tampon phosphate salin - sérum albumine bovine). La protéine rP40-Alexa488 ou la protéine glycophorine-Alexa488 est alors ajoutée à 2×10^{-6} M. Une 15 cinétique d'internalisation est effectuée en incubant les cellules avec les protéines marquées à l'Alexa, à 37°C, de 15 minutes à 2 heures. Un contrôle négatif d'internalisation est réalisé dans les mêmes conditions en changeant les paramètres suivants : ajout d'azide de sodium 20 0,01 % au tampon PBS-BSA et incubation des cellules à 4°C avec les protéines marquées à l'Alexa.

Après incubation, les cellules sont alors lavées 3 fois avec du tampon PBS-BSA, resuspendues dans 100 μ l de ce même tampon puis cytocentrifugées sur des lames de 25 microscope. Les lames sont ensuite analysées par microscopie confocale.

Résultat

L'observation des cellules incubées à 37°C avec rP40-Alexa montre un marquage intracytoplasmique détectable dès 30 30 minutes et toujours observé après 2 h d'incubation : un résultat représentatif, obtenu après 1 h d'incubation à 37°C est présenté dans la Figure 5B. Un marquage membranaire mais pas intracytoplasmique est observé lorsque les cellules sont incubées à 4°C avec rP40 (cf. Fig. 5A), alors qu'aucun marquage n'est observé en présence de glycophorine-Alexa (après incubation à 4°C comme à 37°C). L'exemple d'Alexa, molécule chimique, démontre que toute

molécule chimique couplée à P40 peut ainsi être délivrée aux cellules présentatrices d'antigènes y compris les cellules dendritiques.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

5 (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: PIERRE FABRE MEDICAMENT
- (B) RUE: 45 PLACE ABEL GANCE
- (C) VILLE: BOULOGNE
- (E) PAYS: FRANCE
- 10 (F) CODE POSTAL: 92100 CEDEX

(ii) TITRE DE L' INVENTION: UTILISATION D'UNE PROTEINE
OmpA D'ENTEROBACTERIE, POUR LE CIBLAGE
SPECIFIQUE D'UNE SUBSTANCE BIOLOGIQUEMENT
ACTIVE QUI LUI EST ASSOCIEE VERS LES CELLULES
PRESENTATRICES D'ANTIGENES TELLES QUE LES
CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES

20 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- 25 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version
#1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1035 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Klebsiella pneumoniae

(ix) CARACTERISTIQUE:

5 (A) NOM/CLE: exon

(B) EMPLACEMENT: 1..1032

(ix) CARACTERISTIQUE:

10 (A) NOM/CLE: intron

(B) EMPLACEMENT: 1033..1035

(ix) CARACTERISTIQUE:

15 (A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 1..1032

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

	ATG AAA GCA ATT TTC GTA CTG AAT GCG GCT CCG AAA GAT AAC ACC TGG	48
	Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp	
20	1 5 10 15	
	TAT GCA GGT GGT AAA CTG GGT TGG TCC CAG TAT CAC GAC ACC GGT TTC	96
	Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe	
	20 25 30	
25	TAC GGT AAC GGT TTC CAG AAC AAC AAC GGT CCG ACC CGT AAC GAT CAG	144
	Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln	
	35 40 45	
30	CTT GGT GCT GGT GCG TTC GGT GGT TAC CAG GTT AAC CCG TAC CTC GGT	192
	Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly	
	50 55 60	
35	TTC GAA ATG GGT TAT GAC TGG CTG GGC CGT ATG GCA TAT AAA GGC AGC	240
	Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser	
	65 70 75 80	
40	GTT GAC AAC GGT GCT TTC AAA GCT CAG GGC GTT CAG CTG ACC GCT AAA	288
	Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys	
	85 90 95	

	CTG GGT TAC CCG ATC ACT GAC GAT CTG GAC ATC TAC ACC CGT CTG GGC Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly 100 105 110	336
5	GGC ATG GTT TGG CGC GCT GAC TCC AAA GGC AAC TAC GCT TCT ACC GGC Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly 115 120 125	384
10	GTT TCC OGT AGC GAA CAC GAC ACT GGC GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly 130 135 140	432
15	GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT CGT GAC ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr 145 150 155 160	480
20	CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC GAC GCG GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro 165 170 175	528
25	GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG GGC GTT TCC TAC CGC TTC GGT CAG GAA Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu 180 185 190	576
30	GAT GCT GCA CCG GTT GCT CCG GCT CCG GCT CCG GCT CCG GAA GTG Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val 195 200 205	624
35	GCT ACC AAG CAC TTC ACC CTG AAG TCT GAC GTT CTG TTC AAC TTC AAC Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn 210 215 220	672
40	AAA GCT ACC CTG AAA CCG GAA GGT CAG CAG GCT CTG GAT CAG CTG TAC Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr 225 230 235 240	720
	ACT CAG CTG AGC AAC ATG GAT CCG AAA GAC GGT TCC GCT GTT GTT CTG Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu 245 250 255	768

	GGC TAC ACC GAC CGC ATC GGT TCC GAA GCT TAC AAC CAG CAG CTG TCT		816
	Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser		
	260	265	270
5	GAG AAA CGT GCT CAG TCC GTT GAC TAC CTG GTT GCT AAA GGC ATC		864
	Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile		
	275	280	285
10	CCG GCT GGC AAA ATC TCC GCT CGC GGC ATG GGT GAA TCC AAC CCG GTT		912
	Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val		
	290	295	300
15	ACT GGC AAC ACC TGT GAC AAC GTG AAA GCT CGC GCT GCC CTG ATC GAT		960
	Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp		
	305	310	315
			320
20	TGC CTG GCT CCG GAT CGT CGT GTA GAG ATC GAA GTT AAA GGC TAC AAA		1008
	Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys		
	325	330	335
	GAA GTT GTA ACT CAG CCG GCG GGT TAA		1035
	Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly *		
	340		

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 30 (A) LONGUEUR: 344 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp

1 5 10 15

Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe
 20 25 30

Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln
 5 35 40 45

Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly
 50 55 60

10 Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser
 65 70 75 80

Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys
 85 90 95

15 Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly
 100 105 110

Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly
 20 115 120 125

Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly
 130 135 140

25 Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr
 145 150 155 160

Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro
 165 170 175

30 Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu
 180 185 190

Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val
 35 195 200 205

Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn
 210 215 220

40 Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr
 225 230 235 240

Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu
245 250 255

Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser
5 260 265 270

Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile
275 280 285

10 Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val
290 295 300

Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp
305 310 315 320

15 Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys
325 330 335

Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly
20 340

feuille avant rectification

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments pour le ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes.
5
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments se fixe spécifiquement sur les cellules présentatrices d'antigènes.
10
3. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments est internalisée dans les cellules présentatrices d'antigènes.
15
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont choisies parmi les cellules dendritiques, les monocytes ou les lymphocytes B.
20
5. Utilisation selon la revendications 4, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont les cellules dendritiques.
25
6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue à partir d'une culture de ladite entérobactérie par un procédé d'extraction.
30
7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.
35

8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

5 9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que la séquence d'acide aminé de ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, comprend :

- a) la séquence d'acide aminé de séquence SEQ ID N° 2 ;
- b) la séquence d'acide aminé d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ;
ou
- c) la séquence d'acide aminé d'un fragment d'au moins 5 acides aminés d'une séquence telle que définie en a) ou b).

15 10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est choisie parmi les peptides, les lipopeptides, les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides et les substances chimiques.

11. Utilisation selon la revendications 10, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que le couplage par liaison covalente est un couplage chimique.

30 13. Utilisation selon la revendications 12, caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou de ladite substance biologiquement active pour faciliter le couplage chimique.

14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.
- 5 15. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.
- 10 16. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 15, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est un antigène ou un haptène.
- 15 17. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 16, pour moduler la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène.
- 20 18. Utilisation selon la revendication 17, pour améliorer la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène.
- 25 19. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 18, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une maladie par une substance active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à son internalisation par des cellules présentatrices d'antigènes.
- 30 20. Utilisation selon la revendication 19, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une maladie par une substance active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à son internalisation par des cellules dendritiques.

21. Utilisation selon l'une des revendications 19 et 20, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les cancers, de préférence les cancers associés à un antigène tumoral, les maladies auto-immunes, les allergies, les rejets de greffes, les maladies cardiovasculaires, les maladies du système nerveux central, les maladies inflammatoires, les maladies infectieuses ou les maladies liées à une immunodéficience.
- 10 22. Utilisation selon la revendication 21, pour la préparation d'une composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir ou à traiter une maladie infectieuse ou un cancer associé à un antigène tumoral.
- 15 23. Utilisation selon l'une des revendications 19 à 22, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre un adjuvant de l'immunité.
- 20 24. Utilisation selon l'une des revendications 19 à 23, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité.
- 25 25. Utilisation selon la revendication 24, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous la forme d'un liposome, d'un vecteur viral ou d'une cellule hôte transformée capable d'exprimer une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

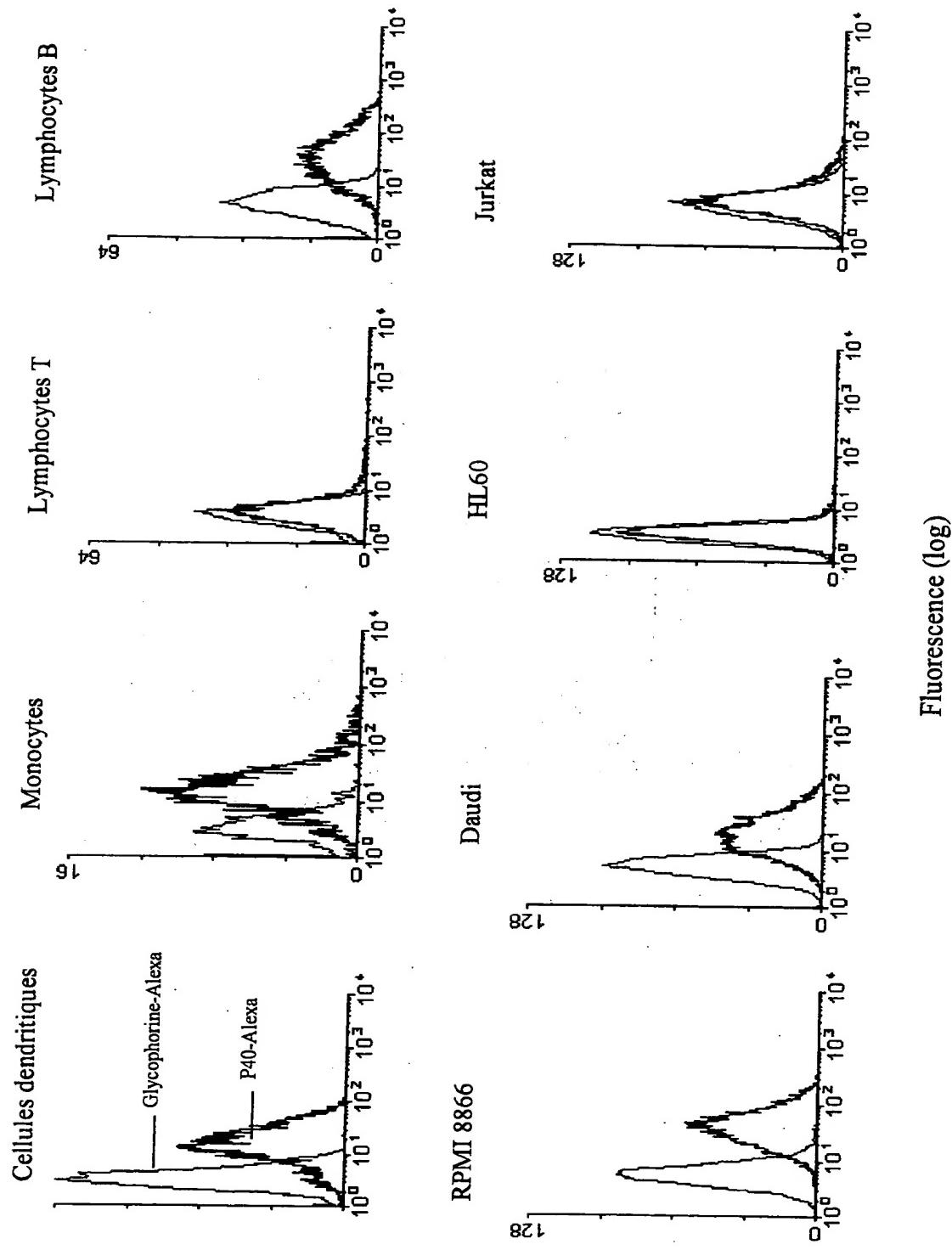
ORIGINAL

CABINET REGIMBEAU
CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
26, Avenue Kléber
75116 PARIS

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments se fixe spécifiquement sur les cellules présentatrices d'antigènes.
3. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments est internalisée dans les cellules présentatrices d'antigènes.
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont choisies parmi les cellules dendritiques, les monocytes ou les lymphocytes B.
5. Utilisation selon la revendications 4, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont les cellules dendritiques.
6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue à partir d'une culture de ladite entérobactérie par un procédé d'extraction.
7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

1/4



Fluorescence (log)

FIGURE 1

CABINET REGULÉ
ORIGINAL

nombre de cellules

2 / 4

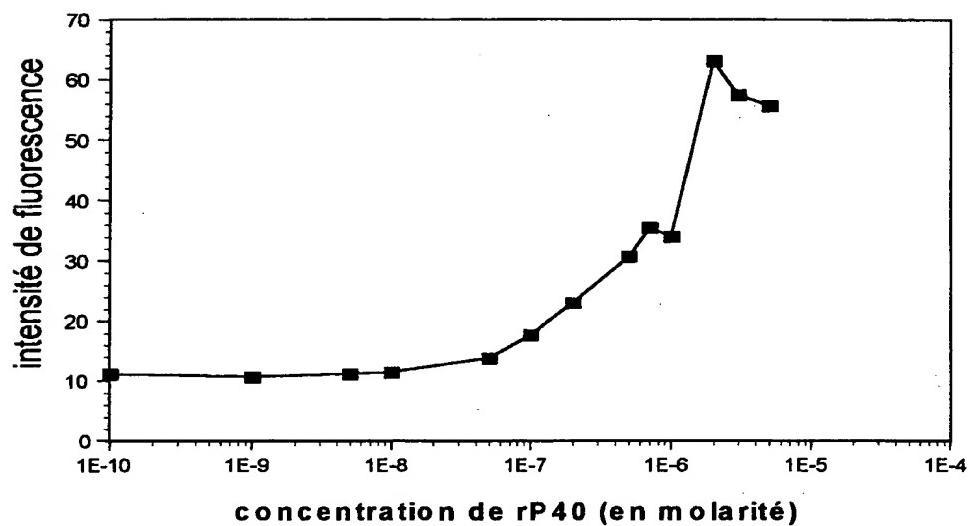


FIGURE 2

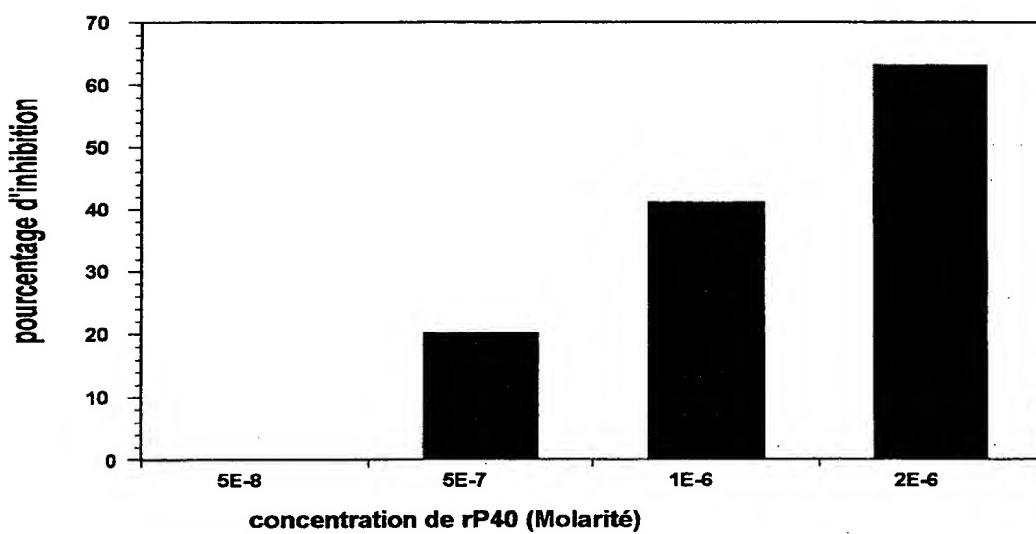


FIGURE 3

CABINET REGIMBEAU
ORIGINAL

3/4

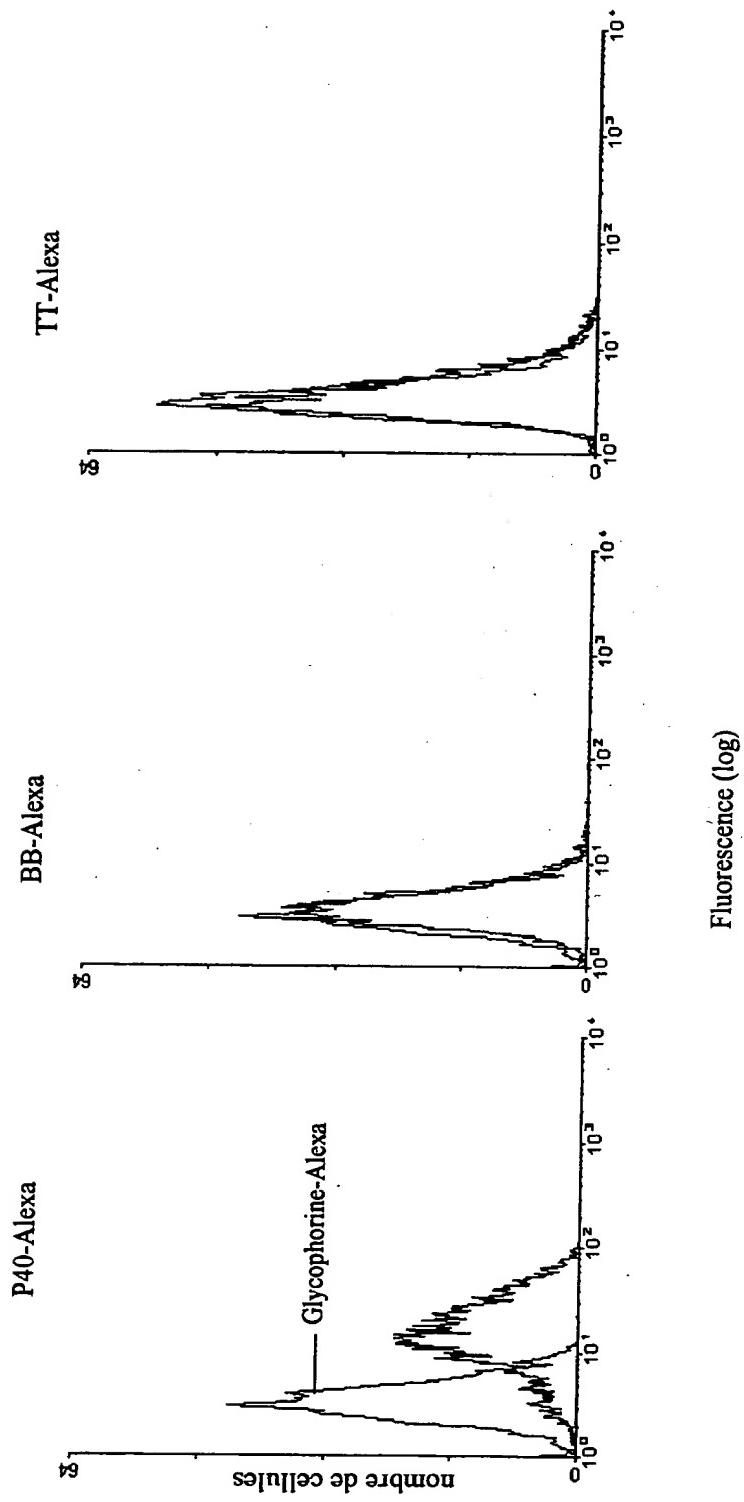


FIGURE 4

4/4

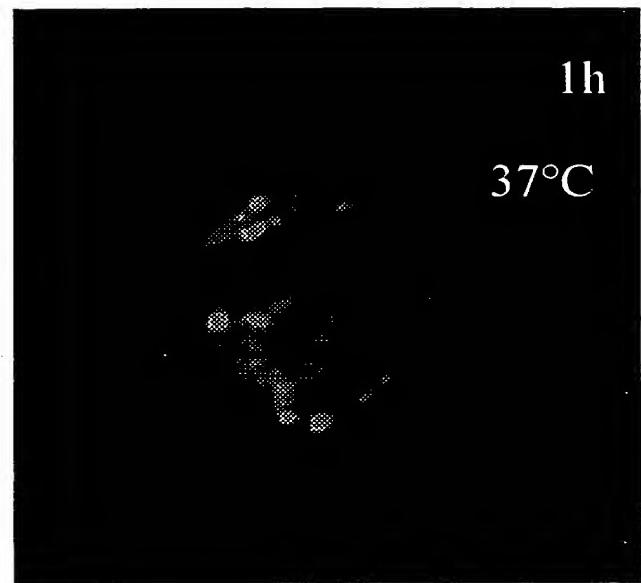
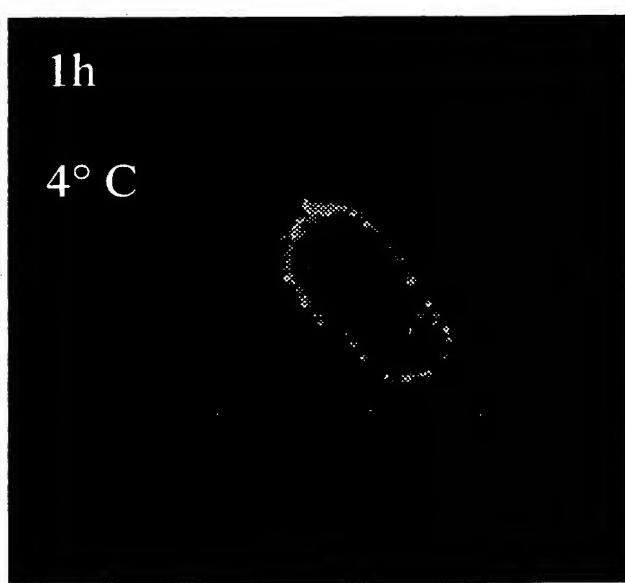


FIGURE 5A

FIGURE 5B